

## ESTABELECIMENTO E REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Crambe abyssinica* HOCHST

**Elias Terra Werner<sup>1</sup>, Ludymila Brandão Motta<sup>1</sup>, Madlles Queiroz Martins<sup>1</sup>, Edilson Romais Schmidt<sup>2</sup>, Taís Cristina Bastos Soares<sup>3</sup>, José Augusto Teixeira do Amaral<sup>3</sup>, Andreia Barcelos Passos Lima<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Alto Universitário s/nº, Alegre-ES, CEP: 29.500-000, Caixa Postal 16, elias\_werner@ig.com.br, ludybrm@yahoo.com.br, mqm\_agroline@hotmail.com.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Rodovia BR-101 Norte, Km. 60, s/nº, Bairro Litorâneo, São Mateus-ES, CEP: 29.932-540, edilsonr@terra.com.br.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Produção Vegetal, Alto Universitário s/nº, Alegre-ES, CEP: 29.500-000, Caixa Postal 16, tcbsoares@yahoo.com.br, jata@cca.ufes.br, albarcelos@hotmail.com.

**Resumo-** O trabalho teve como objetivo testar o efeito de diferentes concentrações de BAP e 2,4-D sobre a indução de brotação a partir de diferentes explantes e o estabelecimento de uma metodologia de micropropagação que viabilize a multiplicação massal de *Crambe abyssinica* HOCHST. Segmentos apicais caulinares e cotiledonares foram submetidos a três tratamentos: A1-controle, A2-10µM de 6-BAP e A3-20µM de 6-BAP. Para os segmentos apicais o tratamento com 20µM de 6-BAP foi significativamente maior que o controle, com 4,3 brotos/explante, porém não diferiu da concentração 10µM de 6-BAP, que apresentou 3,55 brotos/explante. Os segmentos do hipocótilo foram submetidos aos tratamentos: H1-controle, H2-10µM 6-BAP, H3-20µM 6-BAP, H4-1µM 2,4-D, H5-2µM 2,4-D, H6-10µM 6-BAP + 1µM 2,4-D, H7-10µM 6-BAP + 2µM 2,4-D, H8-20µM 6-BAP + 1µM 2,4-D e H9-20µM 6-BAP + 2µM 2,4-D. Os segmentos do hipocótilo apresentaram maior formação de calos no tratamento “H9” (5,6 calos), em relação ao controle e aos tratamentos com apenas um dos reguladores de crescimento testados. Não houve formação de calos nos tratamentos “H1”, “H2” e “H3”, sugerindo que certo nível de 2,4-D é requerido para formação de calos.

**Palavras-chave:** *Crambe abyssinica*, regeneração *in vitro*, reguladores de crescimento, biodiesel.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas.

### Introdução

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.) é pertencente à família Brassicaceae e originária do Mar Mediterrâneo, sendo extensamente plantada no México e Estados Unidos. Trata-se de uma espécie antes, basicamente, destinada a produção de forragem (30 a 32% de proteína bruta), que tem sido bastante cultivada, visando à extração de óleo vegetal (NEVES et al., 2010).

Com os atuais incentivos à busca de fontes de energias renováveis, a cultura de *C. abyssinica* vem ganhando papel de destaque na produção de biodiesel por suas diversas vantagens, como, alta produção de biomassa com rápido ciclo de vida (colhida em torno de 90 dias), alta produtividade de sementes (1000 e 1500 kg/ha), o baixo custo de produção e um percentual de óleo total na semente que fica entre 26 e 38%, superando, por exemplo, a soja, nesta última característica (PAULOSE; KANDASAMY; DHANKHER, 2010). Além de ser utilizada na produção de biodiesel, pode ser viável na fitorremediação, sendo eficiente na descontaminação de arsênio, cromo e outros metais pesados (ARTUS, 2006), sendo também

útil na indústria de plástico e lubrificante, devido ao alto percentual de ácido erúico (50 a 60%) (PITOL, 2008).

Entretanto poucos trabalhos foram realizados com o crambe, tendo em vista seu emprego na agroenergia. Assim, abre-se um vasto campo para investigação que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa cultura com o intuito de melhorar aspectos agrônômicos e tecnológicos para seu emprego na indústria de biodiesel.

De acordo com as normas internacionais de qualidade, para o aumento na produção de biodiesel é necessário buscar novas oleaginosas que produzam óleos não comestíveis (JEFFERSON, 2006), para isso, uma produção homogênea e em larga escala é necessária. Nesse contexto, as técnicas de cultivo *in vitro* são importantes tanto para a propagação massal, quanto como ferramenta para trabalhar com outras técnicas biotecnológicas.

O desenvolvimento de um protocolo eficiente de estabelecimento e regeneração do crambe *in vitro* pode viabilizar posteriores estudos relacionados ao melhoramento genético da

espécie, como a poliploidização, hibridização somática e transgenia, alterando, dessa forma, características agronômicas importantes na produção de biodiesel.

O trabalho teve como objetivo testar o efeito de diferentes concentrações de BAP e 2,4-D sobre a indução de brotação a partir de diferentes explantes visando o estabelecimento de metodologias de micropropagação que viabilize a multiplicação massal de *C. abyssinica* HOCHST.

## Metodologia

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre/ES.

Foram utilizadas sementes de *C. abyssinica* Hochst, safra de 2009, obtidas junto à Fundação MS, localizada em Maracujá-MS.

As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente com detergente neutro, e em condições assépticas na câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas por imersão em álcool 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio comercial (cloro ativo: 2-2,5%) por 10 min e lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Foram utilizados 110 tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) meia força, suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,5 g/L de agar, o pH 5,8 e com duas sementes por tubo.

O meio de geminação foi autoclavado a 121 °C a pressão de 1,1 atm por 20 minutos. As sementes foram submetidas às condições da sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), permanecendo nestas condições por 15 dias. Cinco dias antes da retirada de explantes para os testes de regeneração as plântulas foram transferidas para o escuro para estiolamento dos segmentos a serem utilizados. As avaliações de porcentagem de germinação e número de plantas normais foram realizadas aos 20 dias após a inoculação.

Após a germinação e desenvolvimento, as plântulas obtidas foram utilizadas como fontes de explantes para testes de indução de brotos. Foram utilizados segmentos apicais caulinares (10 mm) mantidos com uma folha definitiva, segmentos cotiledonares (10 mm) e segmentos do hipocótilo (2-3 mm).

Os segmentos apicais e cotiledonares foram submetidos a três tratamentos: A1-controle (ausência de regulador de crescimento); A2-10 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e A3-20 µM de BAP. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e 20 repetições, onde cada repetição (tubos) recebeu um explante (parcela) inoculado em

posição vertical. As análises de número de brotos por explante foi realizada após 14 dias de inoculação.

Os segmentos do hipocótilo foram submetidos a nove tratamentos: H1-controle (ausência de regulador de crescimento); H2-10 µM BAP; H3-20 µM BAP; H4-1 µM 2,4-D (2,4-diclorofenoxyacético); H5-2 µM 2,4-D; H6-10 µM 6BAP + 1 µM 2,4-D; H7-10 µM BAP + 2 µM 2,4-D; H8-20 µM BAP + 1 µM 2,4-D e H9-20 µM BAP + 2 µM 2,4-D. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com nove tratamentos e cinco repetições, onde cada repetição (frascos) recebeu dez explante (parcelas) inoculados na posição horizontal sobre a superfície do meio. As análises de número de brotos por explante e número de calos por frasco foi realizada após 14 dias de inoculação.

O meio basal utilizado para todos os tratamentos foi o MS completo, suplementado com 30 g/L de sacarose, 6,5 g/L de agar, o pH aferido para 5,8 e autoclavado a 121°C a pressão de 1,1 atm por 20 minutos. Foram utilizados 10 ml e 20 ml de meio nos tubos e frascos, respectivamente. As culturas foram submetidas às mesmas condições da sala de crescimento referida no tópico de germinação.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009) e para a comparação múltipla das médias foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## Resultados

Após a desinfestação foi obtido 38,63% de germinação e 62,35% das sementes germinadas se desenvolveram em plântulas normais. O início da germinação se deu aos dois dias após o acondicionamento nos tubos de ensaio e o estágio de plântulas foi alcançado ao final da primeira semana após a inoculação *in vitro*, e aos 15 dias já havia ocorrido a emissão das folhas iniciais.

Os resultados do efeito das concentrações de BAP sobre a regeneração do crambe a partir de segmentos apicais estão apresentados na Tabela 1. O uso de BAP, principalmente na concentração de 20 µM, foi vantajoso para estimular a brotação. O tratamento com 20 µM de BAP foi significativamente maior que o controle, com média de 5,8 brotos gerados por explante, porém não diferindo estatisticamente da concentração 10 µM de BAP, que apresentou média de 5,85 brotos por explante.

Os resultados dos testes com cotilédones não foram apresentados, pois ainda não foram observadas respostas significativas na indução de brotos.

Tabela 1 - Efeito de BAP sobre a indução de brotação em *C. abyssinica* Hochst a partir de segmentos apicais caulinares, 14 dias após inoculação.

Tratamentos	Nº brotos / explante
Controle	2.50 b
10 µM BAP	5.85 a
20 µM BAP	5.80 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como apresentado na Tabela 2, os segmentos do hipocótilo apresentaram formação de calos em todos os tratamentos que continham 2,4-D sozinho ou com BAP, sendo o 2,4-D eficiente na indução de calos em *C. abyssinica*. Principalmente nos tratamentos com altas concentrações de BAP (20 µM) e 2,4-D (2 µM), houve maior formação de calos, com média de 5,6 calos por repetição, valor este estatisticamente diferente do controle e dos tratamentos com apenas um dos dois reguladores de crescimento testados. No tratamento controle e nos tratamentos apenas com BAP não houve formação de calos, sugerindo que certo nível de 2,4-D é requerido para induzir a formação de calos. Não houve qualquer formação de brotos nesses explantes até o presente.

Tabela 2 - Efeito de BAP, 2,4-D e sua combinação na formação de calos em segmentos de hipocótilo de *C. abyssinica* Hochst, 14 dias após inoculação.

Tratamentos	Nº calos
Controle	0 b
10 µM BAP	0 b
20 µM BAP	0 b
1 µM 2,4-D	0,4 b
2 µM 2,4-D	1,0 b
10 µM BAP + 1 µM 2,4-D	0,4 b
10 µM BAP + 2 µM 2,4-D	3,0 ab
20 µM BAP + 1 µM 2,4-D	3,2 ab
20 µM BAP + 2 µM 2,4-D	5,6 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A Figura 1 mostra todo o processo de germinação, desenvolvimento de plântulas e o

surgimento de brotos e calos a partir dos diferentes explantes de *C. abyssinica*.

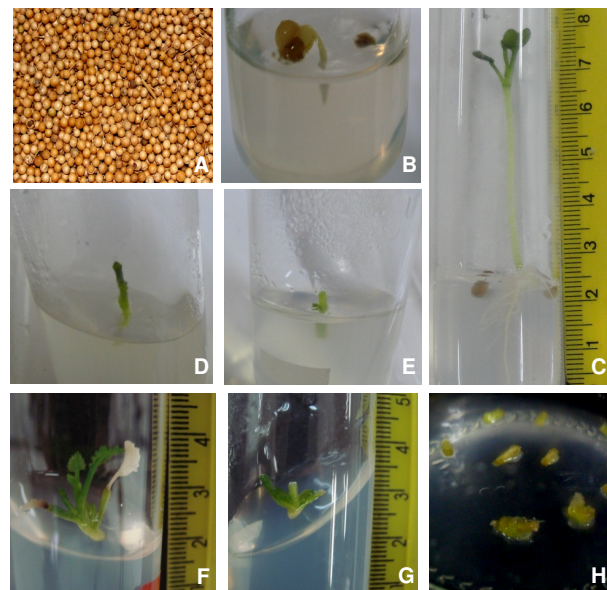


Figura 1 - Aspectos do desenvolvimento *in vitro* das sementes, regeneração de brotos e calogênese de *C. abyssinica* Hochst. A - Aspecto morfológico das sementes *ex vitro*. B - Início da germinação aos 2 dias no meio MS $\frac{1}{2}$  força. C - Plântula desenvolvida aos 15 dias no meio MS $\frac{1}{2}$  força. D - Segmento apical do caule inoculado no meio MS com 20 µM de BAP. E - Segmento cotiledonar inoculado no meio MS com 20 µM de BAP. F - Brotos formados a partir do segmento apical caulinar aos 14 dias no meio MS com 20 µM de BAP. G - Início de brotação a partir de segmentos cotiledonares aos 14 dias no MS com 20 µM de BAP. H - Calos formados a partir dos segmentos do hipocótilo aos 14 dias no meio MS com 20 µM de BAP e 2 µM 2,4-D.

## Discussão

Os resultados não satisfatórios referentes ao número de sementes germinadas e plântulas normais deve-se, provavelmente, ao processo de desinfestação. Segundo Andrade et al. (2000), os tratamentos com álcool e hipoclorito geralmente acarretam a diminuição dessa porcentagem ou também, pela não escarificação mecânica das sementes, que sendo avaliada por Ruas et al. (2010), demonstrou ser eficaz no processo de germinação em papel toalha de *C. abyssinica*, em que, sem pericarpo, apresentou maior germinação (89,43%) em relação às sementes com pericarpo (43,71%).

Resultados semelhantes também foram descritos por Neves et al. (2010), observando valores de 38,30% e 52,56%, para sementes com



e sem pericarpo germinadas em papel toalha, respectivamente.

De modo geral, a função básica do pericarpo é proteger as sementes contra abrasões e choques, funcionando como uma barreira à entrada de microorganismos (PEREZ, 1998). Entretanto, em alguns casos, a presença do pericarpo pode proporcionar elevada falta de uniformidade de germinação (VERTUCCI; LEOPOLD, 1983), provavelmente devido à limitação no processo de absorção de água pela semente, ou dificuldade de rompimento pelo eixo hipocótilo-radicular (POPINIGIS, 1985). Portanto, apesar do pericarpo das sementes de *C. abyssinica* não ser impermeável e a germinação *in vitro* favorecer a embebição pela diferença de potencial hídrico, o rompimento ou até mesmo a retirada do pericarpo parece ser vantajoso para o estabelecimento *in vitro*.

A formação dos brotos a partir do segmento apical caulinar teve início no quarto dia e esta rápida resposta deve-se ao crescimento ativo do meristema apical. Segundo Hussey (1986), explantes desse tipo normalmente apresentam boa taxa de regeneração.

Entre as citocininas, o BAP é a mais utilizada e tem sido muito eficiente para promover a multiplicação de partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Contudo, a concentração pode variar bastante em função do tipo de explante, como empregado no presente trabalho, em que segmentos apicais e nodais foram submetidos a concentrações maiores.

As citocininas são indispensáveis na fase de multiplicação para a quebra da dominância apical e indução da proliferação de gemas axilares. Porém, o uso em excesso desse regulador é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, redução do tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, ocasionando sérios problemas na fase de enraizamento (CHAVES; SCHUCH; ERIG, 2005), características essas não observadas nos segmentos apicais de *C. abyssinica*, sugerindo que as concentrações utilizadas não foram tóxicas.

A eficiência do BAP na formação de brotos, via organogênese, foi mais uma vez comprovada neste trabalho, como também vem sido demonstrado para as forrageiras da espécie *Stylosanthes* sp. (HOFFMANN; VIEIRA, 2000; MEIJER; SZABADOS, 1991; VIEIRA et al., 1990), utilizando, dentre outros explantes, segmentos apicais e nodais. Diferentes espécies com potencial para produção de óleo já se mostraram responsivas à indução de brotos na presença de BAP, como *Brassica napus* L. (KHAN et al., 2010),

*Arachis hypogaea* L. (VERMA et al., 2009) e soja (KUMARI; SETTU; SUJATHA, 2006).

A formação de calos é comum em meios com altas doses de reguladores de crescimento (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1990). O desenvolvimento de calo pode ser independente de auxinas e citocininas, dependente de auxinas, dependente de citocininas ou dependente de ambas (JAIN; GUPTA; NEWMAN, 1995). Para *C. abyssinica*, a calogênese foi dependente da auxina 2,4-D. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), a alta razão auxina/citocinina estimula a proliferação celular culminando na formação de calos. Essa combinação foi testada em *C. abyssinica* por Li et al. (2010) relatando que a combinação da citocinina TDZ a 10 µM com a auxina ANA a 2,7 µM apresentou a maior frequência de brotos gerados a partir de segmentos do hipocótilo. Da mesma forma, Luo e Jia (1998) trabalhando com hipocótilos da forrageira *Astragalus adsurgens*, observaram que a associação de 2,4-D com BAP propiciou maior frequência na formação de calos e regeneração de brotos.

Vários fatores envolvidos na regeneração de uma espécie através de cultivo *in vitro* têm sido considerados, incluindo o estágio de desenvolvimento dos explantes, os reguladores de crescimento no meio de cultura e a dependência do genótipo (REYNOIRED et al., 1993; ORLIKOWSKA et al., 1999).

## Conclusão

Entre os testes de indução de brotação visando estabelecer um protocolo para a micropropagação da espécie, o segmento apical, associado à utilização de BAP proporcionou melhor resultado, no entanto, deve-se levar em consideração as fases subsequentes, tais como, multiplicação, enraizamento, aclimatização e estabelecimento em campo. Assim, os resultados obtidos reforçam a necessidade de novos estudos relacionados à otimização do meio, seus componentes e condições de incubação visando uma micropropagação de forma rápida e massal, que produza mudas de qualidade de *C. abyssinica*.

## Agradecimentos

À Fundação MS pela doação do material vegetal e à CAPES pela concessão de bolsa.

## Referências

- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

- ARTUS, N. N. Arsenic and cadmium phytoextraction potential of crambe compared with Indian mustard. **J. Plant Nutr.**, v. 29, p. 667-679, 2006.
- CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281- 1287, 2005.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v.1, p.183-260, 1998.
- HOFFMANN; L. V.; VIEIRA, M. L. C. Resposta *in vitro* e suscetibilidade ao *Agrobacterium* de duas cultivares de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 733-742, 2000.
- HUSSEY, G. Vegetative propagation of plants by tissue culture. **Plant Cell Culture Technology**, Oxford, v. 23, p. 29-66, 1986.
- JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWMAN, R. J. Somatic embryogenesis in woody plants. **Kluwer Academic Publishers**, v.2, 1995.
- JEFFERSON, M. **Sustainable energy development**: performance and prospects. *Renew Energy*, v. 31, p. 57-82, 2006.
- KHAN, I.; ALI, W.; TAKAR, Z. A.; FROOQ, A.; SIKANDAR; AKHTAR, W. Increased regeneration efficiency of *Brassica napus* L. cultivars Star, Westar and Cyclone from hypocotyle and cotyledonary explants. **Nature Precedings**, disponível em: <<http://precedings.nature.com/documents/4781/version/1/files/npre20104781-1.pdf>>, acesso em: nov. 2010.
- KUMARI, B. D. R.; SETTU, A.; SUJATHA, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 243-245, 2006.
- LI, X.; AHLMAN, A.; YAN, X.; LINDGREN, H.; ZHU, L.-H. Genetic transformation of the oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.**, v. 100, p. 149–156, 2010.
- LUO, J.-P.; JIA, J.-P. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. **Plant cell reports**, v. 17, n. 6-7, p. 567-570, 1998.
- MEIJER, E. G. M.; SZABADOS, L. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In: BAJAJ, Y. P. S. (eds.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. London: Springer, v. 10, p. 313-321, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NEVES, M. B. das; TRZECIAK, M. B.; VINHOLES, P. da S.; TILLMANN, C. A. da C.; VILLELA, F. A. **Qualidade fisiológica de sementes de crambe produzidas em Mato grosso do sul**. Disponível em: <[http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia\\_2007/Agroener/trabalhos/Outras%20culturas\\_11\\_OK/Neves\\_1.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/livro/Agroenergia_2007/Agroener/trabalhos/Outras%20culturas_11_OK/Neves_1.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2010.
- ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, E.; MARASEK, A.; KUCHARSKA, D.; Effect of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 59, p. 95-102, 1999.
- PAULOSE, B.; KANDASAMY, S.; DHANKHER, O. P. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 108, p. 1-12, 2010.
- PEREZ, S. C. J. G. A. Limites de temperatura e estresse térmico na germinação de sementes de *Peltophorum dubium*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 20, n. 1, p. 134-142, 1998.
- PITOL, C. Cultura do crambe. **Tecnologia e produção**: milho safrinha e culturas de inverno 2008. Fundação MS, 2008.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, DF: Agiplan, 1985.
- REYNOIRED, J. P.; CHRIQUI, D.; NOIN, M.; BROWN, S.; MARIE, D. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several gerbera species. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 33, p. 203-210, 1993.
- RUAS, R. A. A.; NASCIMENTO, G. B. do; BERGAMO, E. P.; DAUR JÚNIOR, R. H.; ARRUDA, R. G. Embebição e germinação de sementes de crambe (*Crambe abyssinica*). **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 40, n. 1, p. 61-65, 2010.

# XVINIC

Encontro Latino Americano  
de Iniciação Científica

# XI EPG

Encontro Latino Americano  
de Pós Graduação

# VINIC Jr

Encontro Latino Americano  
de Iniciação Científica Júnior

- SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

- VERMA, A.; MALIK, C. P.; GUPTA, V. K.; SINSINWAR, Y. K. Response of Groundnut Varieties to Plant Growth Regulator (BAP) to Induce Direct Organogenesis. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 313-317, 2009.

- VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, A. C. Dynamics of imbibition by soybean embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, n. 1, p. 190-193, 1983.

- VIEIRA, M. L. C.; JONES, B.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledons of *Stylosanthes guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, p. 289-292, 1990.